

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

0151188-1  
SAH  
#3  
6-13-02  
10/086381  
03/04/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 3月13日

出願番号

Application Number:

特願2001-070857

出願人

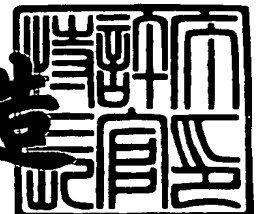
Applicant(s):

株式会社東芝

2001年 9月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3084660

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000007356

【提出日】 平成13年 3月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/00

【発明の名称】 難分解性有機物分解微生物の増殖方法及び難分解性有機物の分解方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝研究開発センター内

【氏名】 伊藤 桂子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝研究開発センター内

【氏名】 池田 理夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝研究開発センター内

【氏名】 今田 敏弘

【特許出願人】

【識別番号】 000003078

【氏名又は名称】 株式会社 東芝

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

【選任した代理人】

【識別番号】 100070437

【弁理士】

【氏名又は名称】 河井 将次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特 2 0 0 1 - 0 7 0 8 5 7

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 難分解性有機物分解微生物の増殖方法及び難分解性有機物の分解方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター属、シュードモナス属、ロドコッカス属、デサルモニル属、アルカリゲネス属から成る群より選択される少なくとも一の微生物を、無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする難分解性有機物を分解し得る微生物の増殖方法。

【請求項 2】 難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター・ブレビス、シュードモナス・ブチーダ、シュードモナス・セパシア、シュードモナス・フルオレセンス、シュードモナス・スツゼリ、ロドコッカス・エリスロポリス、デサルモニル・フィエディジェイ、アルカリゲネス・ユウトロパス、シュードモナス・メンドシナから成る群より選択される少なくとも一の微生物を、無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする難分解性有機物を分解し得る微生物の増殖方法。

【請求項 3】 難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター属、シュードモナス属、ロドコッカス属、デサルモニル属、アルカリゲネス属から成る群より選択される少なくとも一の微生物に、難分解性有機物を接触させることによって難分解性有機物を分解する方法において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物の分解能を制御することを特徴とする方法。

【請求項 4】 難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター・ブレビス、シュードモナス・ブチーダ、シュードモナス・セパシア、シュードモナス・フルオレセンス、シュードモナス・スツゼリ、ロドコッカス・エリスロポリス、デサルモニル・フィエディジェイ、アルカリゲネス・ユウトロパス、シュードモナス・メンドシナから成る群より選択される少なくとも一の微生物に、難分解性有機物を接触させることによって難分解性有機物を分解する方法において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物の分解能を制御するこ

とを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、難分解性有機物を分解し得る微生物の増殖方法に関する。本発明は、微生物を用いて難分解性有機物を分解する方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、排水、地下水、土壌などがトリクロロエチレンなどの揮発性有機塩素化合物に汚染される問題が世界中で起きている。

【0003】

従来、排水や地下水などに溶解している揮発性有機塩素化合物を安く処理するために、活性炭が用いられてきたが、浮遊物が多い液体を処理する場合には活性炭は目詰まりしやすく、また、処理したい物質が低濃度の場合にはコスト高になるという問題がある。さらに、活性炭を用いた場合、最終的には、活性炭に吸着した揮発性有機塩素化合物を処理する必要があるため、化合物に毒性がある場合には処理に危険を伴うだけでなく、一般的燃焼方法では、ダイオキシン類を発生する可能性があり、高度な燃焼管理が必要であると指摘されていた。このような高度な燃焼管理をするには特別な高額設備が必要とされるため、将来的には、活性炭処理費の高騰につながるものと考えられる。

【0004】

そこで、最近、環境への負荷が少ない処理方法として、有機塩素化合物を分解し得る微生物を使った処理方法（バイオレメディエーション）が考案され、汚染土壌中に存在する分解微生物の活動を高めるために、栄養源や酸素を供給する方法、分解能力を高めた微生物を汚染土壌に注入する方法、分解微生物を充填した反応容器内で汚染排水・地下水を分解処理する方法などが報告されている。これらの方法は、何れも汚染物質を分解し、しかも二次汚染を発生しないという従来の方法にはないメリットを有している。

【0005】

しかしながら、微生物を用いた分解では処理に時間がかかることが最大の問題であり、分解能力を向上させる方法が切望されていた。また、微生物の分解能力を人為的に制御することは困難であると考えられており、これまでに温度以外の制御因子は見出されていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来技術に存する上記課題を解決するためになされたものであって、難分解性有機物の分解方法に使用すべき微生物の分解能を増大させること、及び難分解性有機物の分解方法において微生物の分解能を制御することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、請求項1の方法は、難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター属、シュードモナス属、ロドコッカス属、デサルモニル属、アルカリゲネス属から成る群より選択される少なくとも一の微生物を、無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする。

【0008】

また、請求項2の方法は、難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター・ブレビス、シュードモナス・プチーダ、シュードモナス・セパシア、シュードモナス・フルオレセンス、シュードモナス・スツゼリ、ロドコッカス・エリスロポリス、デサルモニル・フィエディジェイ、アルカリゲネス・ユウトロパス、シュードモナス・メンドシナから成る群より選択される少なくとも一の微生物を、無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする。

【0009】

上記課題を解決するために、請求項3の方法は、難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター属、シュードモナス属、ロドコッカス属、デサルモニル属、アルカリゲネス属から成る群より選択される少なくとも一の微生物

に、難分解性有機物を接触させることによって難分解性有機物を分解する方法において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物の分解能を制御することを特徴とする。

【0010】

また、請求項4の方法は、難分解性有機物を分解し得る微生物であって、ジャニバクター・ブレビス、シュードモナス・プチーダ、シュードモナス・セパシア、シュードモナス・フルオレセンス、シュードモナス・スツゼリ、ロドコッカス・エリスロポリス、デサルモニル・フィエディジェイ、アルカリゲネス・ユウトロパス、シュードモナス・メンドシナから成る群より選択される少なくとも一の微生物に、難分解性有機物を接触させることによって難分解性有機物を分解する方法において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物の分解能を制御することを特徴とする。

【0011】

【発明の実施の形態】

〔難分解性有機物分解微生物の増殖方法〕

本発明の第一の方法は、難分解性有機物を分解し得る微生物を無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする前記微生物の増殖方法を提供する。

【0012】

該方法を用いれば、難分解性有機物を微生物に接触させる前に、微生物の有機物分解能を十分に誘導することが可能となる。このため、該方法によって増殖された微生物を用いれば、微生物による難分解性有機物の分解時間をおよそ半分に短縮することができる。また、本発明を用いれば、微生物の増殖速度を2倍程度に増大させることも可能である。

【0013】

本明細書において、「難分解性有機物」とは、土壌、大気、河川などの自然環境の作用では分解されない、又は分解されにくい有機物を意味する。特に有機ハロゲン化合物或いは芳香族化合物である。また「難分解性有機物」には、廃棄物処理法で指定された廃プラスチック類に使用される有機物が含まれる。より具体



的には、トリクロロエチレン、シス-ジクロロエチレン、トランス-ジクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、テトラクロロエチレン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、テトラクロロエタン、塩化ビニル、四塩化炭素、フッ化ビニル、3,3,3-トリフルオロ-2-プロペン、2,3-ジクロロヘキサフルオロ-2-ブテン、臭化ビニルなどのハロゲン化炭素化合物が含まれる。また、フェノール、トルエン、キシレン、クレゾール、ベンゼンなどの芳香族化合物、ナフタレン、ビフェニル、ビスフェノールAなどの多環芳香族化合物、及びポリ塩化ビフェニル（PCB）やダイオキシン類（コプラナPCBを含む）などのそのハロゲン化物も含まれる。

## 【0014】

本方法によって増殖すべき「難分解性有機物を分解し得る微生物」には、前記有機物を分解する能力を有する細菌、酵母、真菌、放線菌、単細胞藻類、及び原生動物が含まれ得る。「難分解性有機物を分解し得る微生物」は、芳香族化合物又は有機塩素化合物を分解し得る微生物、例えば、ジャニバクター・ブレビス（特開平9-201581号、YMCT-001株 工業技術院生命工学工業技術研究所寄託 FERM BP-5282、*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, No.50, 1899-1904, 2000）を含むジャニバクター属；シュードモナス・プチーダ（IFO 3538、*The Journal of Biological Chemistry*, 258, 2923-2928, 1983）、シュードモナス・セパシア（例えばこれに分類されるYMCT-003株（特開平11-75826、FERM BP-6085））、及びシュードモナス・フルオレセンスを含むシュードモナス属；ロドコッカス・エリスロポリス（IFO 12320、*Applied and Environmental Microbiology*, 61, 549-555, 1995）を含むロドコッカス属；デサルフォモニル・フィエディジェイ（DCB-1 ATCC 49306）を含むデサルフォモニル属；バチラス属；ストレプトコッカス属；アルカリゲナス属；アシネトバクター属；アクロモバクター属；パラコッカス属；ロドバクター属；ロドバクテリウム属；メチロシナス属；マイコバクテリウム属；ニトロソモナス属；コリネバクテリウム属の細菌；メタン酸化性細菌；並びにこれらの組合せであり得るが、これらに限定されない。

## 【0015】

本方法において、上記微生物は、難分解性有機物分解能を誘導するために、無機環境下で増殖される。ここで、「無機環境」とは、無機物質、典型的には無機塩類を含有する環境を意味する。無機塩類としては、リン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などを添加し得る。無機塩を含む培地組成の例については、下記表 1 を参照されたい。

## 【0016】

微生物を無機環境下で増殖する際の条件、例えば、温度、pH、及び培地の組成などは、使用する微生物の種類、所望の増殖速度などに応じて実施者が適宜選択すればよい。

## 【0017】

微生物を増殖する工程では、前記微生物は、担体に固定化して、又は担体に固定化せずに増殖される。微生物を担体に固定化すると、代謝の中間段階で産出される毒性物質、温度の急激な変化などの微生物の寿命を短縮し得る外部環境から微生物を保護することができる。従って、本工程においても、一般的には、微生物を担体に固定化することが好ましい。

## 【0018】

微生物を担体に固定化するには、例えば、担体に吸着する方法及び包括する方法がある。微生物を吸着すべき担体としては、不織布、木質発砲体、シリカ系多孔質セラミックス、多孔質ガラス、炭素繊維チップ、ビスコース発泡体、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールを挙げることができるが、これらに限定されない。微生物を包括すべき担体としては、寒天、アガロース、アルギン酸ゲル、 $\kappa$ -カラギーナンゲル、ポリアクリルアミドゲル、ポリビニルアルコールゲル、ポリエチレングリコール等の高分子ゲルや光架橋性高分子を挙げることができるが、これらに限定されない。

## 【0019】

微生物を増殖する上記工程では、前記微生物の分解能を誘導する物質（以下、誘導物質と称する）が、連続的に、又は間歇的に添加される。前記微生物がハロゲン化炭素化合物を分解し得る微生物である場合には、前記誘導物質は、トルエンモノオキシゲナーゼ、トルエンジオキシゲナーゼ、フェノールハイドロキシラ

ーゼ、ビフェニルジオキシゲナーゼ等の芳香族化合物を代謝する酵素の基質であり得、例えば、フェノール、トルエン、クレゾール、ベンゼン、1-ブロモナフタレン、ブロモベンゼン、ジクロロベンゼン、トリクロロベンゼン、ポリ塩化ビフェニル類などの必要に応じて置換された芳香族化合物であり得る。誘導物質が芳香族化合物である場合、置換基は、直鎖又は分枝鎖アルキル基、直鎖又は分枝鎖アルキレン基、直鎖又は分枝鎖アルキニル基、水酸基、ハロゲン基、及びカルボキシル基などの一般的な置換基又はそれらの組合せであり得る。あるいは、誘導物質は、窒素、硫黄、又は酸素を含む複素環式化合物であり得る。また上記誘導物質は、同時に分解対象物質でもある。

## 【0020】

本方法において、誘導物質は、前記微生物による難分解性有機物の分解を誘導させ得る任意の濃度で添加される。例えば、誘導物質が芳香族化合物である場合、誘導物質の濃度は、0.1 mg/L ~ 10 g/L、より好ましくは、1 ~ 1000 mg/L、さらに好ましくは、10 ~ 500 mg/Lであり得る。

## 【0021】

本方法の上記工程では、前記誘導物質とともに、鉄イオンが添加されることを特徴とする。前記誘導物質が芳香族化合物である場合、誘導物質を分解する酵素の多くは、活性中心に鉄イオンを有し、鉄イオンは、該酵素における電子移動を仲介することにより芳香族化合物の代謝を触媒するものと推測されている（例えば、蛋白質 核酸 酵素 45、1339-1349、2000を参照）。それ故、前記微生物を鉄イオンの存在下で増殖すれば、誘導物質の分解能を増大させることができ、最終的には、上記有機物の分解能を増大させることができる。

## 【0022】

本明細書において、「鉄イオン」とは、遊離の鉄イオン又は他の物質に結合若しくは吸着された鉄イオンを意味する。典型的には、鉄イオンは、2価又は3価であり得る。鉄イオンは、錯イオンとして添加してもよい。

## 【0023】

添加すべき鉄イオンの種類は、前記誘導物質の分解酵素に適した種類のイオンであることが好ましい。

## 【0024】

添加すべき鉄イオンの濃度は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 、好ましくは $1 \sim 50 \mu\text{g/L}$ であり得る。鉄イオンの濃度としては、使用する微生物の種類、希望の有機物及び誘導物質の分解速度に応じて適切な濃度を選択すればよい。

## 【0025】

上記工程において添加する鉄イオンの濃度が増加すると、微生物による誘導物質を分解する一連の酵素群が誘導され、誘導物質の消費量が増大する。そして、難分解性有機物は、前記酵素群の共代謝によって分解されるので、鉄イオンの濃度の増加によって、難分解性有機物の分解能も顕著に増加する。従って、誘導物質を随時補充しながら適切な高い濃度の鉄イオンを添加すれば、微生物は、高い分解能を維持し得る。さらに、誘導物質の資化が速められるので、菌体の増殖速度が速くなる。

## 【0026】

一方、鉄イオンの濃度が低下すると、微生物による難分解性有機物の分解能も低下するが、同時に誘導物質の消費量が減少するので、少量の誘導物質で微生物による有機物分解能を長時間維持できるという利点が存する。

## 【0027】

例えば、フェノールを唯一の炭素源として増殖するジャニバクター・ブレビスを用いたときには、鉄イオンの濃度が高いとき（例えば、 $20 \mu\text{g/L}$ 以上）には、フェノールの分解速度と分解能が向上して、難分解性有機物を分解する能力も高くなる。これに対して、鉄イオンの濃度が低いとき（例えば、 $2 \mu\text{g/L}$ 以下）には、フェノールの残存時間が長くなるので、少量のフェノールで分解能を誘導し続けることができる。

## 【0028】

ジャニバクター・ブレビス以外の微生物についても、適切な鉄イオン濃度を選択すれば、微生物の有機物分解能及び誘導物質分解能を適宜調節できる。

## 【0029】

このように、本方法によれば、微生物の増殖工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することによって、微生物による有機

物の分解速度及び誘導物質分解速度、並びに微生物の増殖速度を増大させることが可能となる。

## 【 0 0 3 0 】

別の側面によれば、本発明は、微生物の増殖工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することによって、難分解性有機物又は誘導物質の分解能が向上した微生物を生産する方法にも関する。

## 【 0 0 3 1 】

さらに別の側面によれば、本発明は、担体に固定化された微生物の増殖工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することによって、難分解性有機物又は誘導物質の分解能が向上した微生物が固定化された担体を製造する方法、及びこのような担体が収容されたバイオリアクターを生産する方法にも関する。

## 【 0 0 3 2 】

## 〔難分解性有機物の分解方法〕

本発明は、難分解性有機物を分解し得る微生物に難分解性有機物を接触させることにより難分解性有機物を分解する工程において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物が前記難分解性有機物を分解する能力を制御することを特徴とする難分解性有機物の分解方法も提供する。

## 【 0 0 3 3 】

本方法で分解すべき難分解性有機物は、上記第一の方法について記載したとおりであり、最も典型的には、汚染水、汚泥、汚染された土壌などの浄化すべき汚染試料に含有された難分解性有機物であり得る。従って、本方法は、このような汚染試料を浄化するために使用することができ、別の側面によれば、このような汚染試料を浄化する方法でもあり得る。

## 【 0 0 3 4 】

本方法では、難分解性有機物を分解し得る微生物に難分解性有機物を接触せしめることにより、難分解性有機物を分解する。本方法で使用する微生物は、上記第一の方法について記載した微生物である。

## 【 0 0 3 5 】

前記微生物は、難分解性有機物を接触させる前に、予め、適切な培地中で十分に増殖しておくことが好ましい。最も好ましくは、上記第一の方法で増殖させた微生物を使用する。

## 【0036】

本方法においても、前記微生物は、担体に固定化して、又は担体に固定化せずに使用される。本方法においても、一般的には、微生物を担体に固定化することが好ましい。微生物を固定化するための担体は、上述のとおりである。

## 【0037】

必要に応じて微生物を担体に固定化した後、難分解性有機物を含む試料に直接微生物を添加することにより、又は前記微生物が収容されたバイオリアクター中に前記試料を通過させることにより、難分解性有機物を微生物に接触させる。該工程における接触時の条件、例えば、温度、pH、及び組成などは、使用する微生物の種類、所望の分解速度などに応じて実施者が適宜選択すればよい。

## 【0038】

該工程でも、必要に応じて、前記誘導物質を添加してもよいが、微生物が廃液中などに漏出するので、過度の誘導物質を添加すべきではない。

## 【0039】

また、微生物には、基本栄養源として、無機塩類を与える必要がある。無機塩類を含む培地としては、前記第一の方法について記載したものを使用し得る。微生物に無機塩類を供給するには、無機塩類を含有する液を定期的に与えればよく、あるいは、バイオリアクターの分解槽の中に無機塩類を含有する液を充満させればよい。

## 【0040】

本方法は、とりわけ、バイオリアクターを用いた上記有機物の分解処理に使用するのに適している。バイオリアクターを用いた上記有機物の分解処理に本方法を使用する場合、バイオリアクターとしては、微生物を固定化した担体が収容された有機物分解槽を備え、さらに、必要に応じて、前記分解槽の温度を制御するための温度制御装置、前記分解槽中の担体又は汚染試料を分散するための分散手段や担体又は汚染試料を攪拌するための攪拌手段、前記分解槽中の汚染試料を分

解槽から取り出し前記分解槽に返送するための循環システムなどを備えた任意の一般的なバイオリアクターを使用し得る。

【 0 0 4 1 】

本方法では、鉄イオンの濃度を調節することによって、前記微生物の分解能を制御する。本方法で使用するべき鉄イオンの種類は、前記第一の方法と同一である。

【 0 0 4 2 】

微生物によって有機物を分解する際に添加する鉄イオンの量を増加させれば、上述のように、微生物による誘導物質及び有機物の分解能、微生物の増殖速度は増大する。一般的には、有機物を分解する段階では、微生物を急速に増殖させる必要はないので、鉄イオンの濃度は、微生物を準備する立ち上げ時よりも少なくするとよいことが多い。例えば、ジャニバクター・ブレビスを用いたときには、鉄イオンの濃度を  $2 \mu\text{g/L}$  に低下させれば、過剰な菌体の増殖や誘導物質の消費が抑制され、必要且つ十分な菌体量及び分解能力での運転が可能となる。微生物による分解能力や微生物の量が何らかの原因で低下したときには、鉄イオンの濃度を増加させてもよい。このような場合には、誘導物質も新たに添加することが有効である。

【 0 0 4 3 】

以上のように、本発明の第二の方法を用いれば、鉄イオンの濃度を調節することによって、分解工程における微生物の有機物及び誘導物質分解能、並びに微生物の増殖速度を制御することが可能となる。

【 0 0 4 4 】

鉄イオンの濃度を調節することによって、微生物の有機物及び誘導物質分解能、並びに微生物の増殖速度を制御する操作は、廃液中に漏出した有機物又は誘導物質を分解する方法にも転用し得る。廃液中に鉄イオンを添加する場合には、鉄イオンの濃度が  $40 \mu\text{g/L}$  になるようにすると、有機物又は誘導物質の分解速度が速められる。

【 0 0 4 5 】

以下、実施例によって、本発明についてさらに詳細に説明する。

【 0 0 4 6 】

〔実施例 1〕

本実施例では、本発明の第一の方法による微生物の増殖方法、及び該方法によって増殖された微生物の特性について、図 1 及び図 2 を参照しながら説明する。

【 0 0 4 7 】

栄養培地にて培養したジャニバクター・ブレビスを無機塩培地（表 1）15 mL に OD 660 nm が 1 となるように懸濁した。

【 0 0 4 8 】

【表 1】

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9.8g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g/L
MgO	10.75mg/L
$\text{CaCO}_3$	2.00mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.44mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25mg/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.28mg/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.06mg/L
HCl	51.3 $\mu\text{L}$
pH 7.3	

【 0 0 4 9 】

100、200、400 ppm となるようにフェノールを添加し、25℃で振盪培養した。鉄の濃度は、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 mg/L 及び 0.1 mg/L の 2 種（鉄イオンとして 2  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ ）試験した。

【 0 0 5 0 】

このようにして 24 時間増殖させた菌体の増殖率及び有機塩素化合物の分解能



を図1及び図2に示す。

【0051】

図1から明らかなように、鉄の濃度が低いとき ( $2\mu\text{g/L}$ ) には、誘導物質であるフェノールの濃度にかかわらず、菌体増加率に有意な増加はみられなかった。これに対して、鉄の濃度が高いとき ( $20\mu\text{g/L}$ ) には、フェノールの濃度が増加するとともに、菌体増加率が有意に増加した。菌体増加率は、最大2倍弱まで増加した。

【0052】

有機塩素化合物の分解能力は、25mLバイアル瓶に無機塩培地に懸濁した菌体 ( $\text{OD}_{660\text{nm}}=0.2$ ) 10mLを入れ、密栓した後、シス-1, 2-ジクロロエチレン (DCE) 1ppm分を添加し、25℃で1時間振盪して、ヘッドスペースのDCE残存量をGC-PIDで測定することによって評価した。

【0053】

図2から明らかなように、低い濃度の鉄 ( $2\mu\text{g/L}$ ) の存在下で増殖した菌体は、フェノール濃度にかかわらずほぼ一定の分解率しか示さなかった。これに対して、高い濃度の鉄 ( $20\mu\text{g/L}$ ) の存在下で増殖した菌体は、フェノール濃度の増加とともに高いDCEの分解率を有していた。鉄とフェノールの両者の濃度が高い条件で増殖した菌体は、鉄とフェノールの濃度がともに低い条件で増殖した菌体と比べて、ほぼ2倍の分解率を示した。

【0054】

本実施例によって、誘導物質の存在下で高い濃度の鉄を添加して菌体を増殖すると、菌体増加率を向上させ、且つ高い有機物分解能を有する微生物を取得し得ることが明らかとなった。

【0055】

〔実施例2〕

本実施例では、本発明の第一の方法によって増殖した、担体に包括固定された微生物の増殖速度について説明する。

【0056】

ジャニバクター・ブレビスをポリビニルアルコールゲルに包括し、固定化担体

を作製した。12%ポリビニルアルコール水溶液にOD660nmが0.5となるように菌体を混ぜた。続いて、バットに広げて凍結し、一晩放置した後、室温でゆっくり融解した。

## 【0057】

この凍結融解操作を3回繰り返した後、ゲルを5mm角に切断した。本担体75mLを無機塩培地75mLに入れ、フェノールを100、又は200ppm分添加して25℃で振盪した。鉄濃度は、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01mg/L及び0.1mg/Lの2種（それぞれ、鉄イオンとして2μg/L、20μg/L）試験した。

## 【0058】

高鉄イオン濃度のものは、翌日フェノールを完全に消費していたので、前日の2倍量のフェノールを添加して振盪を続けた。この操作を4日継続すると、担体の有機塩素化合物分解能は飽和に達した。一方、低鉄イオン濃度のものでは、100ppmのフェノールを添加したときにはフェノールが完全に消費されていたが、200ppmを添加したものではフェノールが残存していた。従って、1日に100ppmずつ添加するフェノールの量を増加させて振盪を続けたところ、2週間後に担体の有機塩素化合物の分解能は、飽和に達した。

## 【0059】

分解能が飽和に達したのは、担体内で菌体が飽和に増殖した結果である。

## 【0060】

以上より、本発明の第一の方法を用いれば、担体に固定化された微生物の増殖速度を3倍強増大させることができ、該方法が、微生物の迅速な立ち上げに極めて有用であることが実証された。

## 【0061】

## 【実施例3】

本実施例では、微生物を増殖させる工程における鉄イオンの濃度とフェノールの分解率、菌体増殖率、及び有機塩素化合物分解能との関係について調べた。

## 【0062】

まず、栄養培地にて培養したジャニバクター・プレビスを無機塩培地10mL

にOD660nmが1となるよう懸濁し、100ppm分のフェノールを添加した。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度を0、0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、及び1mg/Lとなるよう調製し、鉄イオンの濃度とフェノールの分解率（分解開始5時間後）との関係を調べた。分解開始5時間後の分解率を図3に示す。

## 【0063】

図3から明らかなように、鉄イオンの濃度が増加するとともに、フェノールの分解速度が速くなることが明らかとなった。

## 【0064】

次に、栄養培地にて培養したジャニバクター・ブレビスを無機塩培地20mLにOD660nmが1となるよう懸濁し、400ppm分のフェノールを添加した。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度が0、0.001、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1mg/Lとなるように調製し、25℃で振盪した。翌日の菌体増殖率（図4）及びフェノール分解率（図5）を以下に示す。鉄濃度の増加とともに菌体増殖が顕著且つフェノール消費率も高かった。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度が0.2mg/L以上でほぼ一定となった。

## 【0065】

また、1ppmのシス-1, 2-ジクロロエチレンの分解率を指標として有機塩素化合物分解能を調べた。使用したバイアル瓶は25mL容量のもので、OD660nm=0.2とした菌体10mLで試験を行った。0.5時間後の分解率を図6に示す。鉄濃度の増加とともに分解率は上昇し、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度が0.2mg/L以上でほぼ一定となった。

## 【0066】

本実施例によって、微生物を増殖させるときの鉄イオン濃度を適切に選択することによって、微生物に所望の増殖率、有機物分解能、及び誘導物質分解能を付与しえることが明らかとなった。

## 【0067】

## 〔実施例4〕

本実施例では、本発明の第一の方法によって、バイオリアクターを迅速に立ち

上げる操作について説明する。

【0068】

70 Lの気相式バイオリアクター（図7）に、凍結融解法で作製したポリビニルアルコール（PVA）担体を充填した。担体には、有機物分解微生物としてジヤニバクター・ブレビスを包括した。

【0069】

充填塔1は、底辺30 cm、高さ180 cmの円柱形で、微生物固定化PVA担体2の充填高さは、110 cmとした。PVA担体は、12 mm角のものを用いた。担体内部の微生物を十分に増殖させるため、充填塔1の上部からシャワー式でフェノール含有無機塩培地を供給した。該培地は、1日に2回、2.5 L／分の流速で30分間噴霧した。フェノールの濃度は、400 ppmとした。

【0070】

リアクターの性能は、250 ppm V空塔線速度2 cm／分のシスー1，2－ジクロロエチレンガスの分解率（出口ガス濃度／入口ガス濃度）で評価した。供給する無機塩培地中の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃度が0.01 mg／Lのときは、2週間後に分解率が80％となって安定したが、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃度が1 mg／Lのときは、4日後に分解率95％で安定した。

【0071】

本実施例によって、鉄イオンの濃度を高く設定することで、リアクターの立ち上げ期間を大幅に短縮し得るとともに、微生物の有機物分解率を高い値で安定させ得ることが実証された。

【0072】

〔実施例5〕

本実施例では、実施例4の方法で立ち上げたバイオリアクターによる定常運転について説明する。

【0073】

立ち上げ時と同様、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃度が1 mg／L、フェノール濃度400 ppmで、前記バイオリアクターを運転すると、増殖した菌体が担体から漏れ出てきて、リアクター底部や循環液に菌体の塊（スカム）が生じ、連続運転

に支障が生じた。

【0074】

しかし、スカムを除去した後、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃度を $0.01\text{mg/L}$ に、フェノール濃度を $200\text{ppm}$ に下げて運転したところ、菌の過剰増殖は消失し、スカムの形成も僅かになり、運転に支障がなくなった。

【0075】

本実施例により、微生物による有機物の分解工程において鉄イオンの濃度を調整する本発明の第二の方法を用いれば、分解工程時における微生物の増加速度を適切に制御できることが明らかとなった。

【0076】

〔実施例6〕

本実施例では、廃液中に溢出した未分解のフェノール及びシス-1, 2-ジクロロエチレンを分解処理する方法について説明する。

【0077】

バイオリアクターでは、フェノール含有無機塩培地を1日に2回シャワーし、その液を循環させて使用しているが、液中無機塩類の消費に伴い、1ヶ月に2回の割合で循環液を交換する。このような条件下、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度 $0.01\text{mg/L}$ で定常運転を続けた場合、廃液中に未分解のフェノール及びシス-1, 2-ジクロロエチレンが含まれる。

【0078】

しかし、取り出した廃液に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 濃度が $0.5\text{mg/L}$ 以上となるように $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加して放置すると、廃液内に含まれる洩出した微生物の分解能が上昇し、2日後にはいずれも検出下限以下まで分解された。また、廃液を加温して $30^\circ\text{C}$ 程度にすると、さらに分解時間は短縮され、1日後にはいずれも検出されなくなった。

【0079】

フェノール及びシス-1, 2-ジクロロエチレンが検出されなくなったことを確認した後、 $\text{NaOH}$ を加えて $\text{pH}$ を9以上にして1晩放置した。廃液中からは生菌は観察されず、菌体はアルカリによって死亡したことが分かる。

## 【0080】

以上より、廃液中に微生物が含まれる場合には、廃液に鉄イオンを添加することによって、廃液中の誘導物質及び有機物の分解速度を上昇させ得ることができ、並びに誘導物質及び有機物を分解した後に、廃液にアルカリを添加すれば、微生物を容易に死滅させ得ることが明らかとなった。本実施例の方法は、微生物による環境浄化の効果をより完全にする上で、非常に有用である。

## 【0081】

## 〔実施例7〕

種々の菌種、分解対象物に対して、Fe添加の効果を調べた。「初期Fe濃度」は一定で、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01mg/Lとし、「添加後Fe濃度」は、表2～4に示すとおり適宜設定した。1時間あたりの分解量を、初期Fe濃度のときとFe添加後とで比較し、それぞれ「初期分解量」、「添加後分解量」として表2～表4に示す。いずれの場合もFe添加により、分解量が増大することが確かめられた。しかしながら、Feの大過剰濃度(100mg/L)では効果が少なかった(実施例B-5)。

## 【0082】

【表 2】

表 2 Fe 添加による分解量の変化

実施例 /比較例	菌種	誘導物質	分解 対象物	初期 Fe 濃度 * 1	初期 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	添加後 Fe 濃度	添加後 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	分解量比 * 2
実施例 A-1	ジャニバクター ・フレピス	なし	フェノール	0.01	150	0.1	390	2.6
実施例 A-2	ジャニバクター ・フレピス	なし	フェノール	0.01	150	0.5	510	3.4
実施例 A-3	ジャニバクター ・フレピス	なし	フェノール	0.01	150	1	540	3.6
比較例 A	ジャニバクター ・フレピス	なし	フェノール	0.01	150	0.01	150	1
実施例 B-1	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	0.05	17.8	1.3
実施例 B-2	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	0.1	19.2	1.4
実施例 B-3	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	1	19.6	1.4
実施例 B-4	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	10	19.6	1.4
実施例 B-5	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	100	17.5	1.25
比較例 B	ジャニバクター ・フレピス	フェノール	cis-1,2- ジクロロエチレン	0.01	14	0.01	14	1

\* 1 Fe 濃度 :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  濃度 (mg/L)

\* 2 分解量比 = 添加後分解量 / 初期分解量

【表 3】

実施例 /比較例	菌種	誘導物質	分解 対象物	初期 Fe 濃度 * 1	初期 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	添加後 Fe 濃度	添加後 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	分解量比 * 2
実施例 C	シュードモナス ・フチーダ	ピフェニル	PCB	0.01	2	0.1	2.4	1.2
比較例 C	シュードモナス ・フチーダ	ピフェニル	PCB	0.01	2	0.01	2	1
実施例 D	シュードモナス ・フチーダ	なし	トルエン	0.01	85	0.1	128	1.5
比較例 D	シュードモナス ・フチーダ	なし	トルエン	0.01	85	0.01	84	1
実施例 E	シュードモナス ・セバシア	フェノール	トリクロロ エチレン	0.01	23	0.1	48	2.1
比較例 E	シュードモナス ・セバシア	フェノール	トリクロロ エチレン	0.01	23	0.01	23	1
実施例 F	シュードモナス ・フルオレセンス	なし	ピフェニル	0.01	40	0.2	60	1.5
比較例 F	シュードモナス ・フルオレセンス	なし	ピフェニル	0.01	40	0.01	41	1
実施例 G	シュードモナス ・スツゼリ	なし	o-キシレン	0.01	63	0.5	88	1.4
比較例 G	シュードモナス ・スツゼリ	なし	o-キシレン	0.01	63	0.01	64	1

\* 1 Fe 濃度 :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  濃度 (mg/L)

\* 2 分解量比 = 添加後分解量 / 初期分解量

【0084】



【表 4】

表 4 (表 3 のつづき)

実施例 /比較例	菌種	誘導物質	分解 対象物	初期 Fe 濃度 * 1	初期 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	添加後 Fe 濃度	添加後 分解量 ( $\mu\text{g/h}$ )	分解量比 * 2
実施例 H	ロドコッカス ・エリスロポリス	ピフェニル	PCB	0.01	0.1	0.2	0.2	2
比較例 H	ロドコッカス ・エリスロポリス	ピフェニル	PCB	0.01	0.1	0.01	0.1	1
実施例 I	デサルモニル ・フィエディジェイ	ピフェニル	PCB	0.01	0.4	0.2	0.72	1.8
比較例 I	デサルモニル ・フィエディジェイ	ピフェニル	PCB	0.01	0.4	0.01	0.4	1
実施例 J	アルカリゲネス ・ユウトロパス	なし	ジクロロ フェノール	0.01	15	0.1	19	1.3
比較例 J	アルカリゲネス ・ユウトロパス	なし	ジクロロ フェノール	0.01	15	0.01	16	1
実施例 K	シュードモナス ・メンドシナ	なし	トルエン	0.01	46	0.5	106	2.3
比較例 K	シュードモナス ・メンドシナ	なし	トルエン	0.01	46	0.01	48	1
実施例 L	シュードモナス ・メンドシナ	トルエン	トリクロロ エチレン	0.01	33	0.5	53	1.6
比較例 L	シュードモナス ・メンドシナ	トルエン	トリクロロ エチレン	0.01	33	0.01	33	1

\* 1 Fe 濃度 :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  濃度 (mg/L)

\* 2 分解量比 = 添加後分解量 / 初期分解量

【0085】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、微生物の増殖速度及び微生物による有機物の分解速度を増大させることが可能となり、微生物による有機物の分解処理を迅速に行うことが可能である。

また、本発明の方法によれば、微生物による有機物の分解を人為的に制御することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度と微生物の増加率の関係を示した図。

【図 2】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度と微生物による有機物分解能の関係を示した図。

【図 3】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度とフェノールの分解率の関係を示した図。

【図 4】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度と微生物の増殖率の関係を示した図。

【図 5】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度とフェノールの消費率との関係を示した図。

【図 6】

微生物を増殖させる工程における鉄の濃度とシス-1, 2-ジクロロエチレンの消費率との関係を示した図。

【図 7】

本発明の方法を適用し得るバイオリアクターの模式図。

【符号の説明】

1 … 充填塔

2 …微生物固定化 P V A 担体

3 …温度制御装置

4 …貯留タンク

5 …循環ポンプ

6 …循環配管

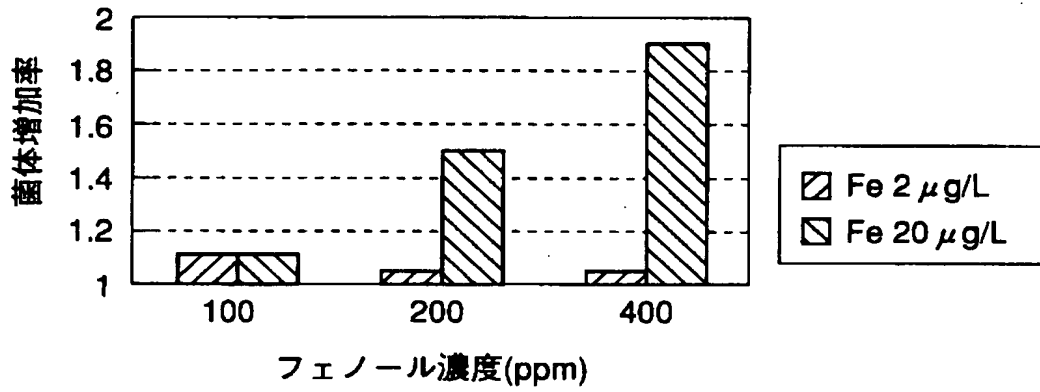
7 …培地供給口

8 …ガス入口

9 …ガス出口

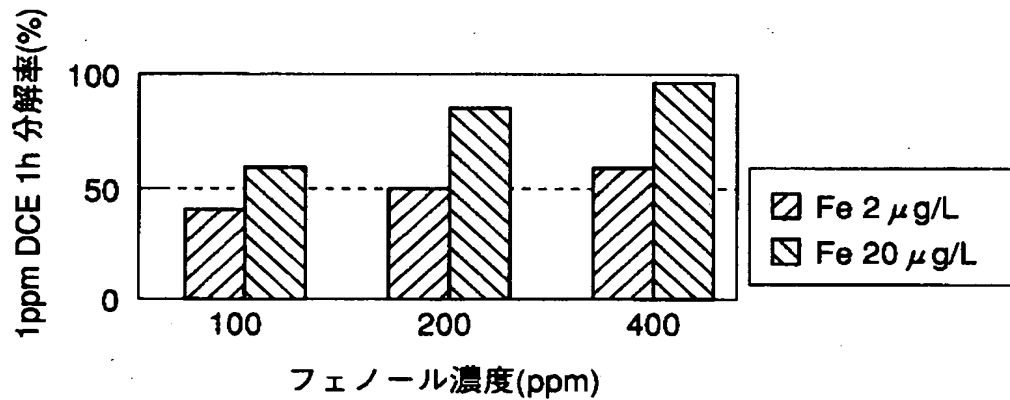
【書類名】 図面

【図 1】



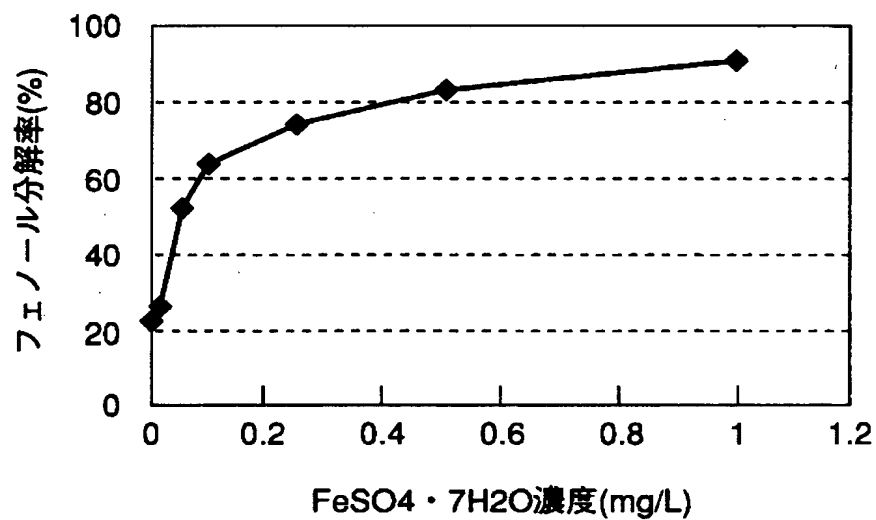
鉄イオン濃度と菌体増殖の関係

【図 2】



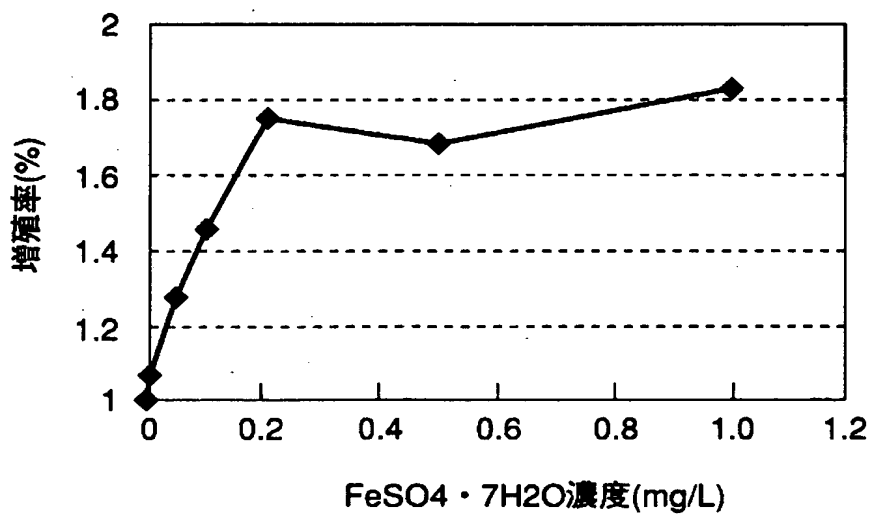
鉄イオン濃度と分解能の関係

【図 3】



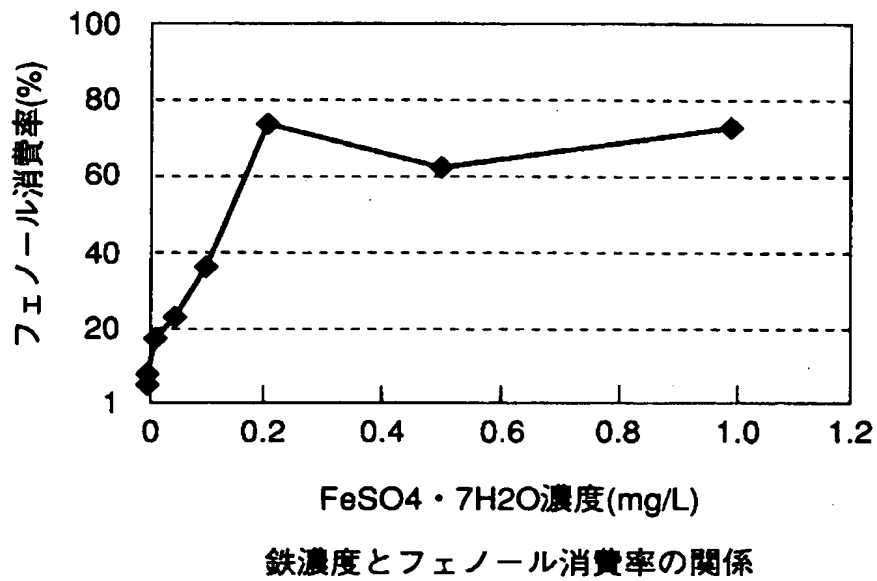
鉄濃度とフェノール分解率(5時間後)の関係

【図 4】

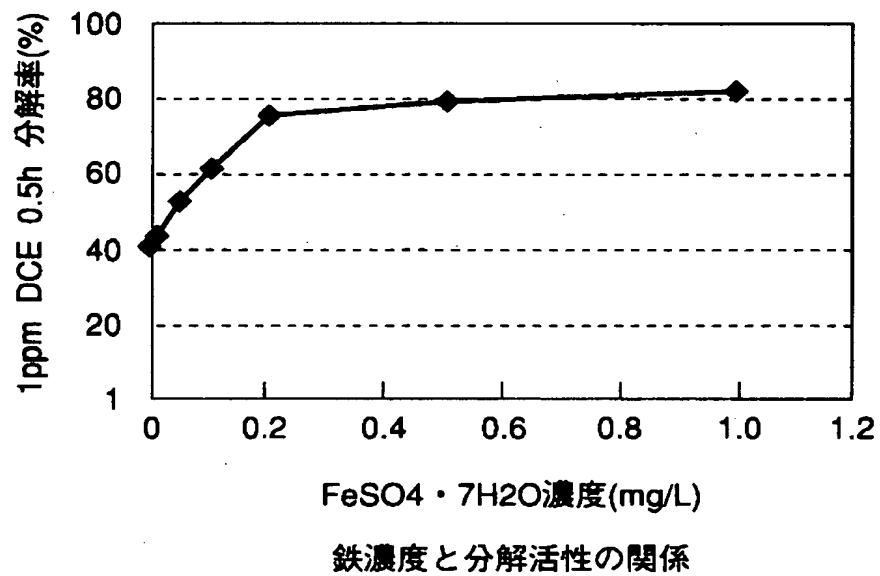


鉄濃度と増殖率の関係

【図 5】

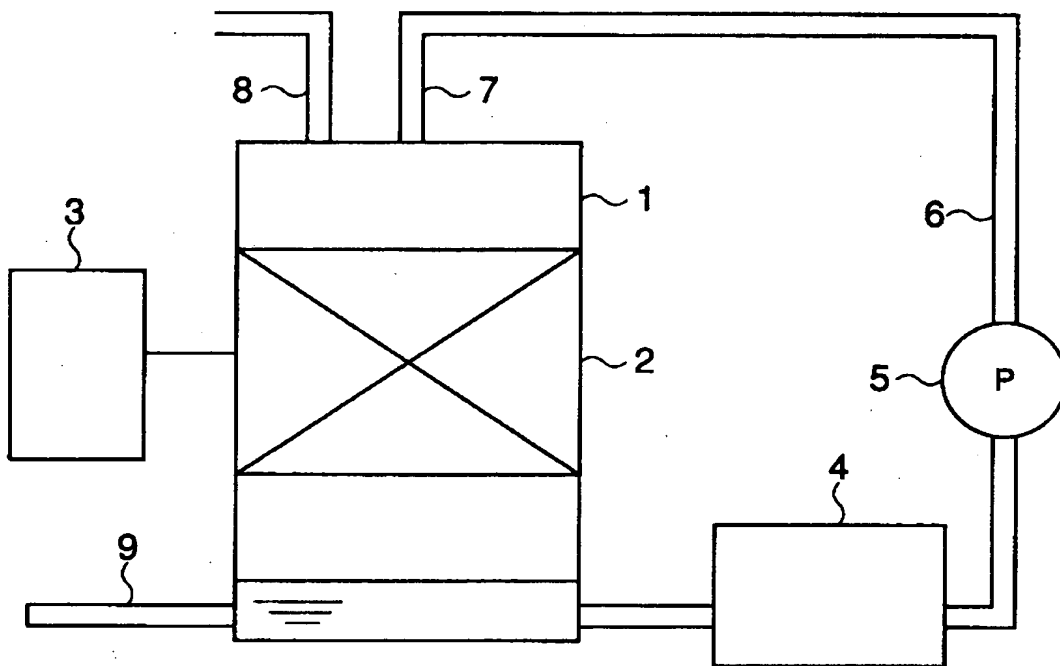


【図 6】



【図 7】

気相式バイオリアクタを模式的に示した図



(符号の説明)

- 1 微生物分解塔
- 2 分解菌固定化ポリビニルアルコール担体
- 3 温度制御装置
- 4 貯留タンク
- 5 循環ポンプ
- 6 循環配管
- 7 培地供給口
- 8 ガス入口
- 9 ガス出口

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、微生物を用いて難分解性有機物を分解する方法に使用すべき微生物の分解能を増大させること、及び微生物を用いて難分解性有機物を分解する方法において微生物の分解能を制御することを目的とする。

【解決手段】 上記課題を解決するために、本発明は、難分解性有機物を分解し得る微生物を無機環境下で増殖させる工程において、前記微生物の分解能を誘導する物質とともに鉄イオンを添加することを特徴とする難分解性有機物を分解し得る微生物の増殖方法を提供する。

本発明は、難分解性有機物を分解し得る微生物に難分解性有機物を接触させることによって難分解性有機物を分解する方法において、鉄イオンの濃度を調節することによって前記微生物の分解能を制御することを特徴とする方法も提供する。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003078]

1. 変更年月日 1990年 8月22日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県川崎市幸区堀川町72番地  
氏 名 株式会社東芝
2. 変更年月日 2001年 7月 2日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都港区芝浦一丁目1番1号  
氏 名 株式会社東芝